

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620121152402

UDC____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

**PERK 通路在内质网应激反应中调控 Yap
基因的转录**

**The PERK Pathway Regulates Yap Transcription
during Unfolded Protein Response**

范鑫

指导教师姓名: 周大旺 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 04 月

论文答辩时间: 2015 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

缩略词.....	VII
摘要.....	VIII
Abstract.....	I
1. 前言.....	1
1.1 Hippo 信号通路的简介.....	1
1.1.1 Hippo 信号通路的发现.....	1
1.1.2 Hippo 信号通路的成员.....	2
1.1.3 Hippo 信号通路和肿瘤生成.....	5
1.2 内质网应激的简介.....	6
1.2.1 内质网应激的概述.....	6
1.2.2 内质网应激与肿瘤生成.....	8
1.2.3 引发内质网压力的常用药物及机理.....	9
1.3 内质网应激的三条通路.....	10
1.3.1 PERK 通路.....	10
1.3.2 IRE 通路.....	12
1.3.3 ATF6 通路.....	13
1.4 立题背景.....	13
2. 实验材料和方法.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.2 实验药品与试剂.....	15
2.3 实验仪器与耗材.....	16
2.4 实验方法.....	17
2.4.1 DNA 相关实验方法.....	17

2.4.1.1 感受态的制备.....	18
2.4.1.2 质粒转化.....	18
2.4.1.3 质粒提取.....	18
2.4.1.4 DNA 的回收和纯化.....	19
2.4.1.5 限制性内切酶消化质粒 DNA.....	20
2.4.1.6 DNA 连接反应.....	21
2.4.2 PCR 相关实验方法.....	21
2.4.2.1 普通 PCR 反应.....	21
2.4.2.2 突变 PCR 反应.....	22
2.4.2.3 实时荧光定量 PCR.....	22
2.4.2.4 细胞全 RNA 的提取.....	23
2.4.2.5 逆转录获取 cDNA.....	24
2.4.3 细胞相关实验方法.....	24
2.4.3.1 细胞培养基及相关溶液配制.....	24
2.4.3.2 细胞的培养和传代.....	24
2.4.3.3 细胞转染.....	25
2.4.3.4 慢病毒的包装和感染.....	25
2.4.3.5 Luciferase 转录活性分析.....	26
2.4.4 蛋白质相关实验方法.....	27
2.4.4.1 蛋白质样品的制备.....	27
2.4.4.2 SDS-PAGE 蛋白电泳.....	27
2.4.5 染色质免疫共沉淀.....	29
3. 结果与分析.....	32
3.1 UPR 能够上调 Yap 的表达，并激活 Hippo 信号通路.....	32
3.1.1 TM 处理 HepG2 细胞，Yap 表达上调，Hippo 通路激活.....	32
3.1.2 Tg 处理 HepG2 细胞，Yap 表达上调，Hippo 通路激活.....	34
3.2 UPR 调控 Yap 依赖于 PERK 通路.....	35
3.2.1 敲低 PERK 显著削弱 UPR 对 Yap 的调控.....	35

3.2.2 敲低 IRE1/ATF6 不能削弱 UPR 对 Yap 的调控.....	38
3.3 ATF4 能够调控 Yap 的转录.....	39
3.3.1 过表达 ATF4, Yap 转录水平上调.....	39
3.3.2 敲低 ATF4, Yap 表达水平下降.....	40
3.3.3 ATF4 能够与 Yap 启动子序列结合.....	41
3.4 eIF2α的磷酸化水平影响 Yap 的表达.....	43
4. 讨论与展望.....	45
参考文献.....	47
致 谢.....	52

Table of contents

Abbreviation	VII
Abstract in Chinese	VIII
Abstract in English	IX
1. Introduction	1
1.1 Review on the Hippo pathway	1
1.1.1 The discovery of the Hippo pathway.....	1
1.1.2 The members of the Hippo pathway	2
1.1.3 Hippo pathway and tumorigenesis.....	5
1.2 Review on the UPR	6
1.2.1 Introduction of the the UPR.....	6
1.2.2 The UPR and tumorigenesis.....	8
1.2.3 Introduction of reagents to induce ER stress.....	9
1.3 Three pathways of UPR	10
1.3.1 PERK Pathway.....	10
1.3.2 IRE Pathway.....	12
1.3.3 ATF6 Pathway.....	13
1.4 Project background	13
2. Materials and methods	15
2.1 Materials	15
2.2 Chemicals and reagents	15
2.3 Equipments and consumables	15
2.4 Methods	17
2.4.1 Experiments and methods for DNA.....	17
2.4.1.1 The preparation of competent cell.....	18
2.4.1.2 Plasmid transformation.....	18
2.4.1.3 Extraction of plasmid DNA.....	18

2.4.1.4 Recovery and purification of DNA.....	19
2.4.1.5 Restriction enzyme digestion of plasmid DNA.....	20
2.4.1.6 DNA ligation	21
2.4.2 Experiments and methods for PCR.....	20
2.4.2.1 General PCR.....	20
2.4.2.2 Site mutation PCR.....	21
2.4.2.3 Real-Time PCR.....	22
2.4.2.4 Isolation of total RNA from cells.....	22
2.4.2.5 Synthesis of cDNA by reverse transcription.....	23
2.4.3 Experiments and methods for cell.....	24
2.4.3.1 Media and solutions for cell culture.....	24
2.4.3.2 Cell culture and passage.....	24
2.4.3.3 Cell transfection.....	25
2.4.3.4 Lentivirus packaging and infection.....	25
2.4.3.5 Adenovirus packaging and infection.....	26
2.4.4 Experiments and methods for protein.....	27
2.4.4.1 The preparation of protein samples.....	27
2.4.4.2 SDS-PAGE.....	27
2.4.5 CHIP.....	29
3. Results and Analysis.....	32
3.1 UPR induces the upregulation of Yap , and activates the Hippo signaling pathway.....	32
3.1.1 TM treatment induces the upregulation of Yap and activation of the Hippo signaling pathway.....	32
3.1.2 Tg treatment can not induce the upregulation of Yap and activation of the Hippo signaling pathway.....	34
3.2 UPR regulates Yap depends on the PERK pathways.....	35

3.2.1 PERK knockdown significantly weaken the UPR regulation of Yap.....	35
3.2.2 IRE1/ATF6 knockdown cannot weaken the UPR regulation of Yap.....	38
3.3 ATF4 can regulate the transcription of Yap.....	39
3.3.1 The overexpression of ATF4 induces the upregulation of Yap..	39
3.3.2 ATF4 knockdown induces the downregulation of Yap.....	40
3.3.3 ATF4 binds with the Yap promoter.....	41
3.4 The phosphorylation level of eIF2α influences the expression of Yap.....	43
4. Discussion and prospect.....	45
Reference.....	47
Acknowledgement.....	52

缩略词

缩写	英文全称	中文全称
TUDCA	tauroursodeoxycholic acid	牛磺熊去氧胆酸
CTGF	connective tissue growth factor	结缔组织生长因子
ER	endoplasmic reticulum	内质网
UPR	unfolded protein response	未折叠蛋白反应
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase	蛋白激酶 RNA 类似内质网激酶
eIF2 α	eukaryotic translation initiator factor 2 α	真核翻译起始因子 2 α
ATF4	activating transcription factor 4	活化转录因子 4
TM	Tunicamycin	衣霉素
Tg	thapsigargin	毒胡萝卜素

摘要

Hippo 信号通路是近年来在果蝇体内发现的一条进化上高度保守的信号转导通路,该通路对控制组织器官大小以及细胞增殖、凋亡有着重要的调节作用。Yap 是 Hippo 信号通路主要的效应分子, Hippo 通路的缺失造成 Yap 的激活,细胞增殖增加,凋亡减少,从而导致器官增大以及肿瘤发生。Hippo 通路通过一系列磷酸化级联反应来调控 Yap 的磷酸化、降解和细胞核定位,从而实现抑制 Yap 的促癌功能。探索 Yap 的调控机制有着重大意义,在本项目研究中我们发现内质网应激能够在转录水平调控 Yap。

内质网应激是真核细胞的一种保护性应激反应,当内质网中有大量未折叠蛋白积累时可触发该应激反应,通过激活一系列通路,减少蛋白质的合成,提高蛋白质折叠能力和降解速率来恢复内质网的稳态,严重情况则诱发细胞凋亡。有研究表明 TUDCA 能够下调大鼠肝脏原代细胞中 CTGF 的 mRNA 水平, TUDCA 被广泛证实能够缓解内质网压力, CTGF 则是 Yap 作为转录共激活因子的靶基因,据此我们推测内质网应激可能对 Yap 有调控作用。我们首先确认了内质网应激能够上调 YAP 的表达,然后分别对内质网应激的三条通路进行研究,发现内质网应激调控 YAP 表达是依赖于 PERK-eIF2 α -ATF4 通路, ATF4 的过表达以及 eIF2 α 磷酸化水平的增加均能导致 Yap 表达的上调。我们在 Yap 的启动子序列上发现了 ATF4 的结合位点,ATF4 是在转录水平调控 YAP 基因。

综上所述,我们发现了 Hippo 信号通路主要效应分子 Yap 新的调控机制,内质网应激的 PERK 通路可显著调控 Yap 基因转录水平,而 Yap 的失控可导致肿瘤的发生,因此内质网应激 PERK 通路可能作为癌症治疗新的靶点。

关键词: Yap; PERK; 转录调控

Abstract

The Hippo signaling pathway was initially discovered in *Drosophila melanogaster*, which is an evolutionary conserved signal transduction pathway. This pathway controls organ size by regulating cell proliferation and apoptosis. Yap is the important effector molecule of the Hippo signaling pathway. The loss of any component upstream of this pathway results in the activation of Yap, increase in proliferation, resistance to apoptosis, massive organ overgrowth and tumorigenesis. The Hippo pathway phosphorylates Yap which promotes Yap cytoplasmic localization and protein degradation. To explore the regulatory mechanism of Yap, we found that the Endoplasmic Reticulum stress response could regulate the expression of Yap.

ER stress response, also called unfolded protein response (UPR), results from an excess of unfolded protein accumulated in endoplasmic reticulum. The UPR could activate a series of signaling pathway, reduce the protein synthesis, and improve the ability of protein folding and degradation rate, so as to build-up homeostasis in endoplasmic reticulum. The chronic UPR could induce cell death. Previous studies showed that TUDCA could significantly decrease the mRNA level of CTGF in rat hepatocyte. TUDCA is widely used to alleviate ER stress, and CTGF is the major target gene of Yap. We speculate that the ER stress may play a regulatory role in *Yap* expression. While three major UPR signals are activated during ER stress, we found that only PERK-eIF2 α -ATF4 pathway regulate Yap expression. In We also found there is a ATF4 binding site in the promoter sequence of Yap. Both the overexpression of ATF4 and increased phosphorylation level of eIF2 α lead to increased Yap expression.

Taken together, we have identified a new regulatory mechanism of Yap. We demonstrate that PERK-eIF2 α -ATF4 pathway control Yap expression during ER

stress reponse. Thus, UPR emerges as a potential therapeutic target in human cancers driven by YAP.

Key words: Yap; PERK; Transcription regulation

厦门大学博士论文摘要库

1. 前言

1.1 Hippo 信号通路的简介

1.1.1 Hippo 信号通路的发现

Hippo 信号通路是近年来在果蝇属中发现的一个高度保守的信号通路，Hippo 信号通路在器官大小及细胞增殖和凋亡的调控方面都具有重要作用^[1]。Hippo 信号通路的功能发生异常时，细胞将过度增殖，凋亡减少，器官体积增大，最终导致肿瘤的发生^[2]。1995 年, Hippo 信号通路的第一个成员 Warts(Wts)在果蝇属中被发现，Wts 编码一个 Dbf-2 相关的核家族蛋白激酶^[3]，Wts 的突变可以导致组织过度生长，Wts 是哺乳动物中 Lats(Large tumor suppressor gene)的同源蛋白。2002 年，Tapon 发现了 Hippo 信号通路的第二个成员，命名为 Salvador(Sav)，Sav 含有 WW 结构域，是哺乳动物中 WW45 的同源蛋白^[4]。2003 年，Duoja Pan 研究小组发现第三个成员，命名为 Hippo(Hpo)，Hpo 是一种 Ser/Thr 蛋白激酶，隶属于 Sterile-20 蛋白激酶家族，是哺乳动物中 Mst1/2 的同源蛋白，Hippo 信号通路的命名就是源于果蝇中 Hippo 基因的发现^[5]，敲除了 Hippo 基因的果蝇头部形似河马（图 1.1）。2005 年，Lai 等人发现第四个成员，命名为 Mats，属于 Mob 蛋白超家族，是哺乳动物中 Mob1 的同源蛋白^[6]。Wts、Sav、Hpo 和 Mats 是 Hippo 信号通路的 4 个核心激酶。随后在 2005 年，Huang 等人利用酵母双杂交的筛选方法发现了一个能够和 Wts/Lats 相结合的蛋白，并将其命名为 Yorki (Yki)，Yki 是 Hippo 下游主要的效应因子^[7]，能够通过结合转录因子 Scalloped (Sd)来调控转录过程，Yki 是哺乳动物中 Yap 的同源蛋白。至此，Hippo 信号通路的发现大致完成。

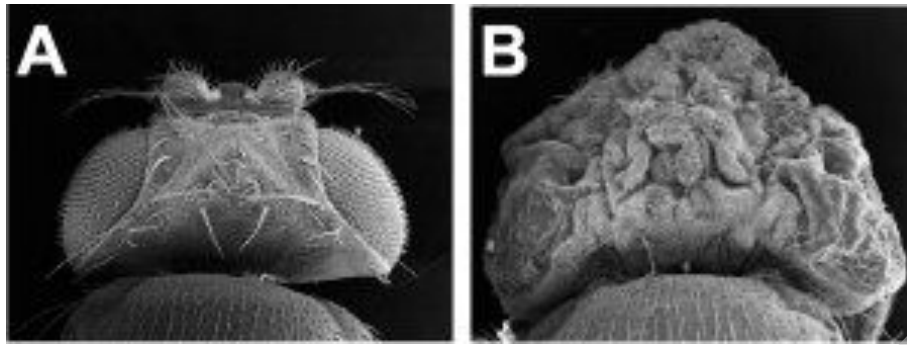


图 1.1 野生型果蝇 (A) 与 Hippo 基因敲除果蝇 (B)^[6]

Fig.1.1 Wild fruit flies (A) and Hippo knockout flies (B)^[6]

1.1.2 Hippo 通路的成员

Hippo 通路是一条在进化上极为保守的信号通路，果蝇中该通路核心成员由 Hpo、Sav、Wts、Mats、Yki 组成；分别对应于哺乳动物中的 Mst1/2、WW45、Lats1/2、Mob1、Yap/TAZ^[7]。哺乳动物 Hippo 信号核心蛋白分子中，Mst1/2 为蛋白激酶，WW45 和 Mob1 为构架蛋白，Yap/TAZ 为转录共激活因子(图 1.3)。在上游信号分子作用下，Mst1/2 磷酸化而激活，并与 WW45 结合磷酸化 Lats1/2，激活的 Lats1/2 与 Mob1 结合，磷酸化 Yap/TAZ，使之与 14-3-3 蛋白结合而滞留在细胞质内，并通过泛素化途径降解。未被磷酸化的 Yap/TAZ 是激活的，可入核与 TEAD 等结合进而使转录调控功能^[8]。

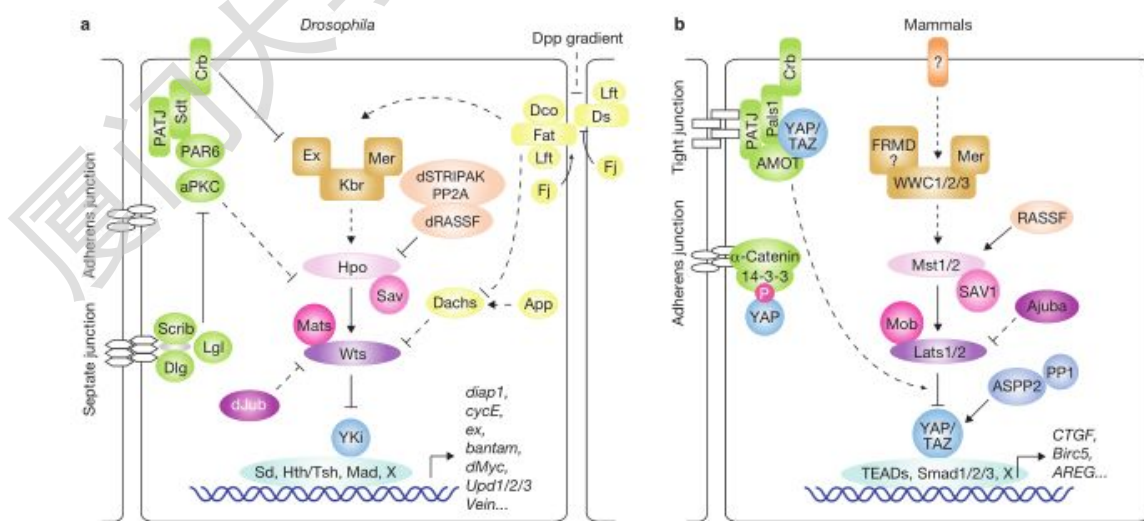


图 1.2 果蝇(a)和哺乳动物(b)的 Hippo 信号通路^[8]

Fig.1.2 Hippo signal pathway in drosophila (a) and mammals (b)^[8]

Mst1 和 Mst2 属于 STE20 蛋白激酶家族成员,氨基酸序列的相似度达 70%,其中 Mst2 在催化结构上和 Hippo 的同源性更高,研究表明 Mst1 和 Mst2 执行不同的功能^[9]。Mst1/2 的氨基末端有一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化域,羧基末端则有一个螺旋-螺旋区域,被称为 SARAH 结构域^[10]。Mst1/2 在细胞增殖,凋亡等方面发挥着十分重要作用,在 Hippo 信号通路中,作为上游激酶的 Mst1/2 被激活后,能够和构架蛋白 WW45 结合并磷酸化 Lats1/2 以及 Mob1,磷酸化后的 Mob1 也能促进 Lats1/2 的自磷酸化和进一步的激活,最终抑制原癌基因 Yap/TAZ 的功能^[11]。在胚胎发育过程中 Mst1/2 也具有十分重要的作用,Mst1 和 Mst2 全身性双敲小鼠表现出胚胎致死性,Mst1/2 肝脏条件性双敲小鼠则可以存活,短期表现为肝细胞大量增殖,肝脏变大,长期可观察到肿瘤的发生^[11],进一步证明了 Mst1/2 在控制细胞增殖和凋亡,抑制肿瘤等方面的作用。

WW45 是一个构架蛋白,含有两个 WW 结构域和一个 SARAH 结构域,WW45 通过 WW 结构域与含有 PPxY 序列的蛋白相互作用,通过 SARAH 结构域与 Mst1/2 结合^[12]。在 Hippo 信号通路中,WW45 主要与激活的 Mst1/2 结合,促进其对下游 Lats1/2 的磷酸化。过表达 WW45 能够增强 Mst1 所诱导的细胞凋亡^[13, 14],WW45 肝脏特异性敲除的小鼠,肝细胞大量增殖,肝脏变大,最终形成肿瘤^[15],证明 WW45 是一种抑癌基因。

Lats1/2 也是蛋白激酶,属于丝氨酸/苏氨酸的 AGC 家族。Lats 含有一个蛋白结合结构域(PBD)和一个 PPxY 序列,Lats 通过 PBD 结合 Mob1,通过 PPxYX 序列结合含有 WW 结构域的 Yap/TAZ,并使之磷酸化,促使其与 14-3-3 蛋白结合而滞留在细胞质中,从而抑制 Yap/TAZ 的转录调控功能^[16-18]。Lats 的激酶活性依赖于第 909 位丝氨酸和第 1079 位苏氨酸的磷酸化,Ser909 是 Lats 的自磷酸化位点,Mob1 的结合能够促进 Lats 该位点的自磷酸化,Mst1/2 磷酸化 Lats 的位点则是 Thr1079,两个位点磷酸化后 Lats 激活,而后进一步磷酸化 Yap/TAZ 抑制其入核行使功能^[19-22]。

Mob 也是构架蛋白,在进化上高度保守,Mob1 能够激活 Lats 并参与细胞增殖和凋亡的调控^[23]。激活后的 Mst1/2 能够磷酸化 Mob1,促进 Mob1 和 Lats

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.